

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA

**“DETERMINACIÓN DE CAMPYLOBACTER SP EN LA CARNE, VÍSCERAS,
Y HECES, DE POLLOS DE ENGORDE DE UN RASTRO ARTESANAL EN LA
CIUDAD CAPITAL DE GUATEMALA”**

TESIS

PRESENTADA A LA HONORABLE JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE
MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA DE LA UNIVERSIDAD DE SAN
CARLOS DE GUATEMALA

POR:

ERICKA MARÍA CALDERÓN SUÁREZ

COMO REQUISITO, PREVIO A OPTAR AL GRADO ACADEMICO DE
MÉDICA VETERINARIA

GUATEMALA, OCTUBRE 2006

JUNTA DIRECTIVA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

DECANO:	LIC. MARCO VINICIO DE LA ROSA
SECRETARIO:	LIC. MARCO VINICIO GARCIA
VOCAL I:	DR. YERI VELIZ
VOCAL II:	DR. FREDY GONZALEZ
VOCAL III:	DR. EDGAR BAILEY
VOCAL IV:	BR. ROCÍO YADYRA PÉREZ FLORES
VOCAL V:	BR. JOSÉ RAMÍREZ CHANG

ASESORES

DRA. VIRGINIA DE CORZO
DRA. LUCERO SERRANO
DR. GUSTAVO TARACENA
DR. WILSON VALDEZ

HONORABLE TRIBUNAL EXAMINADOR

En cumplimiento con lo establecido por los estatutos de la Universidad de San Carlos de Guatemala, presento a su consideración el trabajo de tesis titulado:

**“DETERMINACIÓN DE *CAMPYLOBACTER SP* EN LA CARNE, VÍSCERAS, Y
HECES, DE POLLOS DE ENGORDE DE UN RASTRO ARTESANAL EN LA
CIUDAD CAPITAL DE GUATEMALA”**

Aprobado por la Junta Directiva, previo a optar al título profesional de:

MÉDICA VETERINARIA

ACTO QUE DEDICO

A Dios padre santo por acompañarme en cada momento de mi vida y darme la oportunidad y la fortaleza para cumplir con mi sueño de estudiar veterinaria.

A mi padre Jorge Calderón Mora que con todo su amor y esfuerzo me dio una carrera universitaria y me brindo todo su apoyo en tantos momentos difíciles.

A mi madre María Elena Suárez Chaverri que siempre la he considerado mi mejor amiga y que junto con mi padre me regaló el estudio y todo el amor que solo una madre sabe dar.

A mi hermano Jorge, Carolina y Camila que siempre me han apoyado y han dado amor y felicidad a mi vida.

A Marianela que ha sido como una hermana para mí y con la que caminé a lo largo de mi carrera dándome fuerza y amistad incondicional.

A Alejandro Oliva y su familia que han sido como una segunda familia para mí, dándome a cada minuto apoyo, amor y una casa donde me siento como si fuera mi propia casa.

A Diego, Brenda, Eddy, Ruby, Paco, Julie, Vannesa, Marielos, Ana Verónica, Herardo, Osley, Lilly, Jannet y Dennis que han dejado una huella de amistad y amor en mi corazón.

A todos mis amigos en Costa Rica que siempre estuvieron apoyándome a pesar de la distancia.

A tantos compañeros y amigos que me apoyaron estando lejos de mi país y que nunca voy a olvidar.

A todos mis asesores les agradezco el apoyo para la realización de esta tesis especialmente la Dra de Corzo.

A todo el personal del Departamento de Microbiología.

A la memoria de un gran profesor y amigo como lo fue el Dr. Roma.

A la Universidad de San Carlos y todos sus profesores que me dieron tantos conocimientos y amistad.

TABLA DE CONTENIDO

I. INTRODUCCIÓN	1
II. HIPÓTESIS.....	3
III. OBJETIVOS.....	4
IV. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
4.1 Historia	5
4.2 Definición.....	6
4.3 Sinónimos.....	7
4.4 Etiología	7
4.5 Caracteres descriptivos del <i>Campylobacter</i> sp.	7
4.5.1 Morfología y tinción.....	7
4.5.2 Anatomía Celular y Composición.....	7
4.5.2.1 Productos celulares	7
4.5.2.2 Características de crecimiento.....	8
4.5.3 Ecología.....	9
4.5.3.1 Reservorio.....	9
4.5.3.2 Colonización.....	9
4.5.3.2.1 Invasión.....	11
4.5.3.2.2 Toxinas.....	12
4.5.3.2.3 Respuesta inmune del hospedero.....	13
4.5.3.2.4 Factores específicos del hospedero para la expresión de la colonización.....	14
4.5.3.2.5 La ecología del <i>Campylobacter</i> fuera del medio ambiente del hospedero.....	14
4.6 Epidemiología.....	15
4.6.1 Incidencia.....	17
4.6.2 Distribución geográfica:	17
4.7 Reservorios y vías de transmisión.....	17
4.7.1 Poblaciones susceptibles.....	20
4.7.2 Poblaciones no susceptibles.....	20
4.8 Consecuencias a largo plazo	21
4.9 Consecuencias del blanco.....	22
4.10 Contaminación en los alimentos.....	22
4.11 Síntomas	23
4.12 Patogenia	24
4.13 Aspectos inmunológicos.....	25
4.13.1 Diagnostico de laboratorio	25
4.13.2 Toma de muestras	26
4.13.3 Examen directo	26
4.13.4 Examen microscópico.....	27
4.13.5 Aislamiento	27
4.13.6 Microbiología molecular y serología	28
4.13.7 Cultivo en medios selectivos	28
4.13.8 Método de filtración para la detección de <i>campylobacter</i> en heces	29
4.13.9 Incubación	30
4.13.9.1 Atmósfera de incubación.....	30
4.13.9.2 Temperatura de incubación.....	31

4.13.10 Examen de las placas	31
4.13.11 Identificación presuntiva	32
4.13.12 Identificación final	33
4.13.13 Diagnostico inmunológico.....	36
4.14 Tratamiento	36
4.15 Resistencias antimicrobianas	36
4.16 Prevención	37
4.17 Impacto en la salud pública	38
4.18 Infecciones por campylobacter en aves	38
V. MATERIALES Y METODOS	40
5.1 Materiales.....	40
5.1.1 Recursos Humanos	40
5.1.2 Equipo de laboratorio.....	40
5.1.3 Recursos Biológicos	41
5.1.4 Medios y soluciones.....	41
5.2 Metodología.....	41
5.2.1 Universo.....	41
5.2.2 Diseño de estudio	41
5.2.3 Obtención y toma de muestras	42
5.2.4 Procedimiento de laboratorio	42
5.2.4.1 Preparación del agar Skirrow en el laboratorio	42
5.2.4.2 Procesamiento de las muestras en el laboratorio.....	43
5.2.4.3 Estudio macroscópico	44
5.2.4.4 Estudio microscópico	45
5.2.4.5 Pruebas bioquímicas para la identificación presuntiva de Campylobacter sp.	46
5.3 Análisis estadístico	46
VI. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	47
VII. CONCLUSIONES.....	49
VIII. RECOMENDACIONES.....	50
IX. RESUMEN.....	51
X. BIBLIOGRAFÍA.....	53
XI. ANEXOS	56

INDICE DE CUADROS

Cuadro No. 1	Resultados obtenidos de la siembra en agar Skirrow para el aislamiento de <i>Campylobacter</i> sp en muestras de heces, vísceras y carne de pollo de engorde de un rastro artesanal de la ciudad de Guatemala, Abril 2005.	60
Cuadro No. 2	Resultados de las pruebas presuntivas en la identificación de <i>Campylobacter</i> sp en muestras de heces, vísceras y carne de pollo de engorde de un rastro artesanal de la ciudad de Guatemala, Abril 2005.	61

INDICE DE FIGURAS

Figura No. 1	Resultados totales de la presencia de <i>Campylobacter</i> sp en muestras de heces, vísceras y carne de pollo de engorde de un rastro artesanal de la ciudad de Guatemala, Abril 2005.	62
Figura No. 2	Resultados de la presencia de <i>Campylobacter</i> sp en muestras de heces (Método Directo) de pollo de engorde de un rastro artesanal de la ciudad de Guatemala, Abril 2005.	63
Figura No. 3	Resultados de la presencia de <i>Campylobacter</i> sp en muestras de heces (Método de Filtración) de pollo de engorde de un rastro artesanal de la ciudad de Guatemala, Abril 2005.	64
Figura No. 4	Resultados de la presencia de <i>Campylobacter</i> sp en muestras de carne de pollo de engorde de un rastro artesanal de la ciudad de Guatemala, Abril 2005.	65
Figura No. 5	Resultados de la presencia de <i>Campylobacter</i> sp en muestras de vísceras (hígado) de pollo de engorde de un rastro artesanal de la ciudad de Guatemala, Abril 2005.	66

I. INTRODUCCIÓN

Hasta finales de la década de 1960, no se había valorado la importancia de la bacteria *Campylobacter* spp, en la salud pública. En los años 70 se describió por primera vez como un agente causal de gastroenteritis bacteriana en el hombre. En años recientes, debido al avance científico, se ha facilitado su diagnóstico y se ha determinado que su incidencia es igual o mayor al de la Salmonelosis. Hoy, en día se le ha puesto mayor atención en la medicina humana, debido a que en algunos países es la principal causa de diarrea de origen bacteriano, sin embargo es muy poco conocida en nuestro medio, probablemente debido a su difícil y caro diagnóstico. Se presenta con mayor frecuencia en niños de corta edad y jóvenes, luego de un periodo de incubación corto. Tiene la característica de no presentarse en brote, sino como casos aislados, y solamente produce infecciones de pasaje transitorio.

La mayor parte de casos de Campilobacteriosis están asociados con la manipulación de los pollos crudos o la ingestión de carne cruda o mal cocida. Un número pequeño de organismos de *Campylobacter* puede ocasionar la enfermedad en seres humanos. Se considera que una sola gota de jugo de carne de pollo cruda contaminada, es suficiente para producir la enfermedad en el hombre. El pollo de engorde es la especie animal en la que más frecuentemente se encuentra el *Campylobacter* spp, especialmente en su hígado, carne y heces.

La avicultura como actividad pecuaria ha ido en aumento y de ahí la importancia de investigar esta bacteria desde el punto de vista de sanidad animal. En Guatemala se producen actualmente 325,600,000 libras de carne de pollo al año. Debido a su trascendental impacto en la economía del país, es

importante implementar medidas de diagnóstico y de prevención en los diferentes niveles de la cadena productiva y así obtener carne libre de contaminación por *Campylobacter* spp.

Para el presente estudio se seleccionó un rastro artesanal de aves, localizado en la ciudad de Guatemala. El propósito de utilizar carne proveniente de un rastro artesanal es que aquí llegan aves de traspatio y aves de granjas semitecnificadas, donde se supone que hay mas probabilidad de contaminación por *Campylobacter* spp.

Esta investigación tiene como propósito demostrar la presencia del *Campylobacter* spp. en la carne, vísceras y heces de pollo de engorde provenientes de un rastro artesanal, utilizando el medio de cultivo de Skirrow.

II. HIPÓTESIS

Existe presencia de *Campylobacter sp.* en la carne, vísceras y heces de pollos de engorde, provenientes de un rastro artesanal, de la capital de Guatemala.

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General:

- Contribuir al estudio sobre la presencia de *Campylobacter sp.* en un rastro artesanal de aves, en Guatemala.

3.2 Objetivos específicos:

- Implementar las técnicas de diagnóstico microbiológico para el aislamiento e identificación de *Campylobacter sp.*; en carne y vísceras de pollo de engorde.
- Determinar la presencia de *Campylobacter sp.* en las heces del pollo de engorde, en un rastro artesanal en la ciudad de Guatemala.
- Determinar la presencia de *Campylobacter sp.* en la carne y vísceras del pollo de engorde, en un rastro artesanal en la ciudad de Guatemala.

IV. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

4.1 Historia

Las primeras observaciones de bacterias semejantes a *Campylobacter* fueron realizadas por Escherich en 1886 a partir de materia fecal de niños y de gatos con diarrea. Aunque no pudo realizar los aislamientos, Escherich denominó *Vibrio felinus* a las bacterias observadas sólo microscópicamente. Los primeros aislamientos de especies del género *Campylobacter* fueron realizados en el área de la microbiología veterinaria en 1909 y 1913. (7)

Mac Fadyean y Stockmann y posteriormente Smith en 1918 establecieron la participación de una bacteria microaerófila en el aborto del ganado bovino y ovino, de morfología similar a las especies del género *Vibrio*, por lo que se la denominó *Vibrio fetus*. (7)

En 1931, Jones y Little aislaron a partir de bovinos con disturbios intestinales un vibrión microaerófilo al que denominaron *Vibrio jejuni*. (7,10)

En 1944, Doyle describió un vibrión aislado del intestino de cerdos con diarrea y lo denominó *Vibrio coli*. (7)

La primera asociación entre estas bacterias curvas y diarrea en el hombre fue sugerida por Levy en 1946, el que realizó un estudio en un brote de gastroenteritis sobre 357 pacientes en dos establecimientos penales en Illinois, observando en exámenes directos la presencia de formas bacterianas semejantes a *Vibrio* en el 20% de las muestras. (7)

En 1957, E. King, estudiando las características de estos vibrios aislados de diferentes fuentes, estableció que no todos correspondían a *Vibrio fetus*, determinando dos grupos con características serológicas y bioquímicas diferentes. Mientras algunos eran capaces de crecer a 25 y 37°C, otros lo hacían a 42°C. A estos últimos se los consideró como Vibrios relacionados, sugiriendo que eran agentes de diarrea aguda. (7,10)

En 1963, Sébald y Veron proponen la creación del género *Campylobacter* para incluir estas bacterias.

En la década del 70, Butzler y Skirrow, Bolton y Robertson, Blazer y Col, desarrollaron medios selectivos que permitieron aislar estos microorganismos con relativa facilidad y establecer su participación en diferentes cuadros infecciosos en el hombre. (7)

En 1972 Dekeyser y Butzlerl aislaron los microorganismos de las heces de pacientes con enteritis aguda usando una técnica de filtración que permitía el pasaje de pequeños bastones curvos a través de una membrana, pero retenía microorganismos fecales más grandes. Esa técnica se utiliza actualmente para el aislamiento de otras especies del género, diferentes de *C. jejuni* subsp. *jejuni* o *C. coli* como son, por ejemplo, *C. upsaliensis*, *C. hyointestinalis* y *C. jejuni* subsp. *doylei*. (7,10)

En 1980, un estudio en colaboración de ocho hospitales en Estados Unidos reportaron que el aislamiento global de *C.jejuni* de muestras fecales fue mayor que el de especies de *Salmonella* y *Shigella*. (10)

4.2 Definición

La campilobacteriosis es una enfermedad infecciosa ocasionada por bacterias del género *Campylobacter*. La mayoría de las personas que enferman con campilobacteriosis contraen diarrea, calambres, dolor abdominal y fiebre dentro de 1 a 5 días después de la exposición al organismo. La diarrea puede ser sanguinolenta y puede ir acompañada de náusea y de vómitos. La enfermedad dura típicamente una semana. Algunas personas que son infectadas con *Campylobacter* no tienen ningún síntoma. En las personas con sistemas inmunológicos comprometidos, el *Campylobacter* se propaga ocasionalmente a la corriente sanguínea y ocasiona una grave infección que pone en peligro la vida. (5, 6)

4.3 Sinónimos

La campilobacteriosis también se conoce a menudo como enteritis o gastroenteritis del *Campylobacter*. (2)

4.4 Etiología

La campilobacteriosis es una enfermedad infecciosa producida por *Campylobacter jejuni*. (2)

4.5 Caracteres descriptivos del campylobacter sp.

4.5.1 Morfología y tinción



Las especies del género *Campylobacter* son bacilos finos curvados y gram negativos de un tamaño de 0.2 a 0.5 μm de anchura por 0.5 a 5 μm de longitud. Cuando dos o más bacilos se colocan juntos tienen forma de S o de alas de gaviota. (2, 10, 1)

4.5.2 Anatomía Celular y Composición

Los microorganismos del género *Campylobacter* poseen la pared celular típica de las bacterias gram negativas, cápsula y flagelos. (2,10)

4.5.2.1 Productos celulares

a) *C.jejuni* segrega una toxina cuya actividad y estructura es semejante a la de la toxina colérica y de la toxina termolábil de *Escherichia coli*. Las subunidades de ambas toxinas están relacionadas inmunológicamente y se

fijan al mismo gangliósido de la superficie de la célula blanco. *C.jejuni* también produce una citotoxina de naturaleza proteica, que es distinta de la toxina shiga de *E.coli* y a la citotoxina de *Clostridium difficile*. (2)

b) *C. jejuni* produce una adhesina resistente a la manosa que se fija a un receptor que contiene fucosa existente en la superficie de la célula blanco. (2)

c) *C. jejuni* sobrevive en el interior de los fagocitos mononucleares, lo cual implica la existencia de otras importantes estructuras de superficie hasta ahora no identificadas.

Los métodos serológicos que se utilizan corrientemente para tipificar *C. jejuni* se basan en la presencia de los antígenos termoestables (posiblemente el LPS) o de los antígenos termolábiles. Ambos sistemas han definido numerosos serotipos y se utilizan para determinar la fuente de los brotes de enfermedad de origen alimentario.

4.5.2.2 Características de crecimiento

Las especies de campylobacter son microaerófilas, necesitando para crecer una atmósfera que contenga concentraciones del 3 al 15% de oxígeno y del 3 al 5% de dióxido de carbono para las condiciones óptimas del crecimiento. Algunas especies, como por ejemplo *C. jejuni* crecerán a la temperatura de 43°C, propiedad que resulta útil para su selección en el aislamiento a partir de fuentes intestinales. A diferencia de las Enterobacteriáceas, las especies de campylobacter son oxidasa-positivas. No fermentan ni oxidan hidratos de carbono, generando energía a partir de aminoácidos o de intermediarios del ácido tricarboxílico por la vía respiratoria. Si bien poseen catalasa y superóxido-dismutasa, estas enzimas son reprimidas por el exceso de peróxido de hidrógeno y por los iones de superóxido que se forman cuando crecen en presencia de concentraciones atmosféricas de oxígeno. (2,10)

Son sensibles a la desecación, a las condiciones ácidas, a la luz solar directa, al oxígeno del 21% y a la mayoría de los desinfectantes. Poseen plásmidos R, a los que se les atribuye su resistencia a las tetraciclinas. (2, 13, 10)

4.5.3 Ecología

4.5.3.1 Reservorio

Los animales y los subproductos animales son las principales fuentes de microorganismos tanto para las personas como para las especies animales sensibles. *C. jejuni* se ha encontrado en la leche, en las canales de aves, y en las heces de los perros y de los gatos.

Los cerdos adquieren *C. hyointestinalis* y *C. mucosalis* a partir de las heces de los cerdos infectados. (2)

Se desconoce el origen de *C. pylori*, de *C. laridis*, aunque se supone que se encuentra en el tracto genital de los animales infectados.

4.5.3.2 Colonización

Bajo condiciones naturales, el *Campylobacter* crece solo cuando ha encontrado un adecuado ambiente en el hospedero. El prerrequisito para el crecimiento es localizar un hábitat adecuado dentro del hospedero para tomar posesión, mantenerse en su lugar, enfrentar la competencia o las defensas del hospedero, adquirir nutrientes, y evitar o responder a cambios hostiles en las condiciones del hábitat. Todos estos eventos son mediados por factores bacterianos. Algunos de estos factores pueden inducir efectos con consecuencias patológicas para el hospedero. (9)

La mayoría de la información disponible acerca de los mecanismos de colonización por *Campylobacter* ha sido derivada de modelos de desafío oral en pollos. Tanto como se puede asegurar, la colonización en mamíferos involucra similares factores bacterianos, aunque la extensión y las consecuencias de la infección pueden ser un diferentes. Experimentalmente, los pollos libres de patógenos de hasta 6 semanas de edad pueden ser utilizados para colonizarlos con dosis tan bajas como 10 UFC del tipo silvestre de cepas de *Campylobacter*. Las características de esta colonización mimetizan la infección natural en pollo de engorde. (9)

Aun así, el desafío experimental de aves jóvenes, que han sido removidas de parvadas comerciales al laboratorio durante la fase de retraso, pueden ser menos confiables, y esta resistencia puede ser asociada con los anticuerpos maternos. (9)

Inicialmente, los organismos se encuentran a través de los intestinos aviares, pero en un periodo corto, la colonización esta confinada al ciego y a la ultima porción del intestino delgado. En 5 días del desafío, el nivel de organismos de colonización en pollos llega a un techo, que es extremadamente alto: hasta 10 UFC por gramo de contenido cecal. Una vez la colonización esta establecida, es crónica, aunque los niveles pueden disminuir después de 9 semanas o más. La colonización intermitente del íleo, yeyuno y duodeno puede ocurrir, y ocasionalmente los organismos pueden ser recuperados del bazo y del hígado, indicando la posibilidad de una infección extra intestinal. El sitio de crecimiento bacteriano es el moco de las células epiteliales del intestino y la bacteria mantiene su posición en el flujo del moco por medio de su rápida y característica motilidad, mediada por sus dos flagelos bipolares. (9)

En vivo hay poca evidencia de adherencia a las células epiteliales subyacentes. Aun así la adherencia in Vitro ha sido reportada. Los flagelos pueden estar involucrados en esto, pero el rol de las fimbrias no puede ser excluido. Sin embargo, ha habido mucho debate recientemente acerca de la

presencia de dichos organelos, y hay poca evidencia de la secuencia del genoma para los genes estructurales de la fimbria. (9)

Las bases moleculares de la colonización son ahora dilucidadas por la comparación de los potenciales de colonización de mutantes definidos con aquellos de cepas silvestres en modelos de pollos. Entre estos factores bacterianos que se consideran importantes para la colonización son, hasta la fecha, productos de los genes con papel en la motilidad, adherencia, protección del stress de oxidación, y regulación dependiente de la temperatura. Los cambio en los perfiles de proteína y antígeno de la bacteria durante la colonización indican que el crecimiento en el medio ambiente del intestino del huésped, involucra una regulación de algunos genes. Este es muy consistente con lo conocido acerca del potencial de colonización mejorado de las cepas atenuadas en laboratorio con pasaje in vivo. (9)

Algunos nutrientes esenciales para el crecimiento de *Campylobacter* pueden estar pobremente disponibles o no disponibles para la bacteria dentro del lumen intestinal. Sin embargo, estos nutrientes como el hierro pueden estar disponibles en los tejidos del hospedero. La bacteria puede desarrollar estrategias, como la producción de toxinas o invasión para acceder a dichos nutrientes dañando la integridad de la mucosa intestinal del hospedero. Dichas estrategias inevitablemente tienen consecuencias patógenas para el hospedero. Durante la campilobacteriosis, la enfermedad entérica sugiere que la expresión bacterial de la toxina y/o la invasión de las células epiteliales son consecuencias potenciales de la colonización. (9)

4.5.3.2.1 Invasión

Una población menor de organismos que colonicen el intestino, parece ser capaz de recorrer el epitelio intestinal y producir una infección sistémica. Esto se refleja en la ocurrencia de fases bacteremicas de la infección y en la

recuperación del bazo e hígado, aun en hospederos infectados en forma comensal. Estos organismos pueden producir septicemia, pero el *C. jejuni* es sensible al suero, y no es un evento muy frecuente. No obstante algunos individuos presentan infecciones extra intestinales consistentes con un organismo invasivo. Las infecciones extra intestinales pueden ocurrir como una consecuencia del movimiento entre, o por una invasión, a través de las células del epitelio intestinal. Ambas pueden ocurrir y son detectables en modelos in Vitro. Sin embargo, es posible que los organismos invasivos puedan localizar nichos, que son protegidos de la respuesta inmune dentro de los hospederos, así permitiendo la persistencia de la infección. No obstante, la presencia de organismos extra intestinales induce una rápida y sustancial respuesta inmune circulante, la cual puede contribuir al auto limitación de la enfermedad. Hasta que la base molecular de la invasión es identificada, el papel de esta propiedad bacteriana en la enfermedad, se mantendrá sin aclarar. (9)

4.5.3.2.2 Toxinas

Toda la evidencia clínica también sugiere que los *Campylobacter* expresan un factor toxigenico durante la enfermedad, el cual se asocia a la colonización del hospedero. Aunque muchas actividades de las toxinas han sido descritas, la secuencia del genoma solo ha identificado un sitio con homología hacia toxinas conocidas. La toxina citoletal distendida (TCD) producida por el *Campylobacter*, afecta la morfología celular epitelial, causando la distensión y la muerte eventual de la célula en modelos in Vitro. La expresión de la TCD varía entre cepas. Esta variación parece ser independiente de su origen y algunos aislamientos son negativos a TDC. Esta negatividad es una consecuencia de la supresión y el polimorfismo dentro de los genes *cdtB*. Las cepas TDC-negativas pueden ser aislados de las heces diarreicas y de la sangres, sugiriendo que la TDC no es esencial para la presentación de

síntomas clínicos de la enteritis o la bacteriemia. El papel de la TDC en la enfermedad es por esta razón debatible. Sin embargo, los datos preliminares de la enfermedad indican que la TDC es expresada en humanos durante la colonización y es altamente inmunogénica. (9)

4.5.3.2.3 Respuesta inmune del hospedero

Para establecer la colonización y para mantener el crecimiento, las bacterias deben de tener la habilidad para sobrepasar la respuesta innata del hospedero y la inmunidad adquirida. Muy poco se conoce acerca de la inmunidad innata hacia el *Campylobacter*, aunque estudios preliminares sugieren, que por los antecedentes genéticos del hospedero, por lo menos en pollos, pueden tener un efecto en la susceptibilidad para la colonización. Las aves que han sido colonizadas, los humanos que han salido de la enfermedad y los humanos expuestos endémicamente, tienen todos anticuerpos circulantes y anticuerpos de mucosa anti-*Campylobacter* que pueden ser detectados. En todos los hospederos, estos anticuerpos son adquiridos rápidamente post desafío, y son dirigidos en contra de múltiples antígenos. La evidencia sugiere que la respuesta inmune inicial puede ser, por lo menos en parte, proteger en contra de desafíos posteriores. En humanos pero no en pollos, esta respuesta temprana puede terminar la colonización. La exposición repetida parece llevarnos a una protección completa contra la enfermedad, pero no necesariamente la forma transitoria de la colonización, en menor grado en humanos y en mayor grado en animales. Esto sugiere que el *Campylobacter* puede tener parcialmente un mecanismo efectivo para evadir la respuesta inmune del hospedero, y que las interacciones entre el hospedero y el patógeno pueden variar entre hospederos. (9)

4.5.3.2.4 Factores específicos del hospedero para la expresión de la colonización

El medio ambiente intestinal de los mamíferos y las aves son muy diferentes. Una diferencia obvia es la temperatura: 43°C para aves y 37°C para humanos. Dichas diferencias de hábitat en los hospederos requieren que el *Campylobacter* se adapte a los diferentes medios para poder maximizar su oportunidad de crecimiento. Los mecanismos bacterianos para la adaptación involucran la regulación de algunos genes. La expresión específica factores bacterianos de humano contra los de ave son muy difíciles de investigar, pero un reciente aislamiento fortuito de una cepa de *C. jejuni* de un pollo, que causaba la enfermedad en un trabajador de investigación, durante una visita a un rastro de aves, esta permitiendo que dichas comparaciones se puedan hacer. Los estudios preliminares con estas cepas, han demostrado la expresión de factores de colonización específicos para los pollos. Estos factores pueden explicar las diferencias en el resultado de la colonización entre hospederos aviares y hospederos humanos. (9)

4.5.3.2.5 La ecología del campylobacter fuera del medio ambiente del hospedero

Para la mayoría de *Campylobacter*, el crecimiento dentro de un hospedero es solamente temporal. Hasta ahora los retos de la transmisión hospedero-hospedero deben de enfrentarse frecuentemente. Una vez el *Campylobacter* es excretado del intestino del hospedero o derramados durante el procesamiento de alimentos, ellos encuentran muchos factores hostiles del medio ambiente. Dichos factores incluyen extremos de temperatura, osmolaridad, concentraciones atmosféricas de oxígeno, y falta de alimento. La supervivencia a dichos factores es un pre requisito para llegar a otro hospedero y continuar su crecimiento. Las condiciones hostiles del medio ambiente

resultan en un número de respuestas fisiológicas, morfológicas y bioquímicas de los *Campylobacter*. Todos estos eventos deben verse como reversibles hasta cierto punto, pero si los factores continúan afectando o se adicionan otros, esto llevara finalmente a la muerte a la bacteria. En los *Campylobacter* la respuesta más obvia al estrés es un cambio de la forma espiral, a una forma de coco. El desarrollo de la morfología de coco es concomitante con una perdida en la habilidad para poder cultivarlo, pero estas dos propiedades son independientes. De manera similar, la habilidad para poder cultivarlo se pierde antes que la viabilidad, como es detectado con el metabolismo de las sales de tetrazolio. Ninguna de estas propiedades puede reflejar cambios en la infectividad de los organismos luego de la presentación de factores de estrés del ambiente. (9)

Durante el procesamiento de la carne, los *Campylobacter* son expuestos a muchos factores ambientales de estrés. Algunas cepas parecen sobrevivir este estrés mejor que otras. Dándole seguimiento al procesamiento de este tipo de cepas que están presentes en las aves vivas, lo hace claro que algunas cepas no sobreviven bien el procesamiento mientras otros son excelentes sobrevivientes. Las razones para estas diferencias no están claras. La secuencia genética del *Campylobacter* ha indicado la presencia de algunos sistemas poco conocidos para regular el estrés. El entender la base molecular de la supervivencia puede ser un componente importante para controlar el riesgo presentado por los *Campylobacter*, en la cadena alimenticia. (9)

4.6 Epidemiología

En las sociedades desarrolladas, las personas adquieren *C. jejuni* de los animales de compañía sintomáticos y asintomáticos (perros y gatos), y de alimentos tales como la leche fresca o los productos de pollería. (2)

Se ha comprobado que las heces de aproximadamente el 10% de los perros asintomáticos y de aproximadamente 5% de los gatos asintomáticos

contienen *C. jejuni*. Estos porcentajes pueden ser mas elevados en animales adquiridos en perreras. (2)

Los ciegos de aproximadamente el 50% de las gallinas de las que se obtienen muestras contienen *C. jejuni*. En el momento del sacrificio, estos microorganismos contaminan el ambiente y, en consecuencia casi todas las canales que se encuentran almacenadas estarán contaminadas. (2)

Del 2 al 100% de los bóvidos pueden ser eliminadores sanos de *C. jejuni*, circunstancia que tal vez explique los brotes de enfermedad diarreica producida por *Campylobacter* como consecuencia del consumo de leche sin pasteurizar. (2)

Los estudios de prevalencia en animales muestran distintos porcentajes para los diferentes tipos de animales y especies de *Campylobacter*. Sin embargo, en los animales concurren muchas especies y serotipos. La especie de *Campylobacter* con mayor prevalencia en aves y ganado es *C. jejuni*; en el ganado porcino, *C. coli*; en los perros, *C. upsaliensis*. Casi todas las infecciones en el hombre (90-95%) se deben a *C. jejuni*. Los pollos de carne a menudo están contaminados con *C. jejuni* y *C. coli*. Hay evidencia contundente de una contaminación cruzada frecuente durante el sacrificio de animales y el procesamiento de productos. Sin embargo, algunos estudios indican que los procesos de sacrificio de animales influyen poco en el riesgo de campilobacteriosis humana. En realidad, la reducción de la carga de *Campylobacter* en las aves parece haber tenido un impacto significativo en el número de casos humanos. La carga de *Campylobacter* en las aves de corral danesas refleja una variación estacional con una mayor tasa de contaminación (50-80%) en el verano (de junio a octubre) y una menor tasa (13-40%) en la temporada invernal (de diciembre a marzo). (4,14)

4.6.1 Incidencia

El Campylobacter es la causa bacteriana más común de la enfermedad diarreica en los Estados Unidos. Prácticamente todos los casos ocurren en eventos aislados y esporádicos, no como parte de brotes grandes. La Vigilancia activa por medio de un sistema de vigilancia especial denominado FoodNet indica que alrededor de 15 casos por cada 100,000 personas en la población, son diagnosticados cada año. Mucho más casos pasan sin diagnosticar o sin notificar y se estima que la campilobacteriosis afecta a más de 1 millones de personas cada año, o 0,5% de la población. La campilobacteriosis ocurre mucho más frecuentemente en los meses de verano que en el invierno. El organismo se aísla de lactantes y jóvenes adultos con más frecuencia que en otros grupos de edades y de los varones con más frecuencia que de las mujeres. Aunque *el* Campylobacter no causa por lo común la muerte, se ha estimado que 500 personas con infecciones de Campylobacter pueden morir cada año. (5, 6)

4.6.2 Distribución geográfica:

La capylobacteriosis es una zoonosis cosmopolita. (2)

4.7 Reservorios y vías de transmisión

El reservorio del *Campylobacter spp.* es el tubo digestivo de un gran número de animales de sangre caliente, principalmente las aves, donde está presente como saprofita y también como patógeno entérico ocasional. (5,6)

La vía fecal-oral, directa o indirecta probablemente sea el principal modo de difusión. La infección tiene lugar como consecuencia de la ingestión de un producto animal originariamente contaminado con heces infectadas. (2)

La campilobacteriosis ocurre en casos únicos y esporádicos, pero también puede ocurrir en brotes, cuando un número de personas enferman todas a la vez. La mayoría de los casos de campilobacteriosis están asociados con la manipulación de pollos crudos o la ingestión de carne de pollo cruda o no cocinada suficientemente y derivados de aves. Un número muy pequeño de organismos *Campylobacter* (menos de 500) pueden ocasionar la enfermedad en los seres humanos. Incluso una gota de jugo de carne de pollo cruda puede infectar a una persona. Una forma de infectarse ocurre cuando se corta carne de pollo en una madera de cortar y luego se utiliza la madera de cortar sin lavarla, o el utensilio, para preparar legumbres u otro alimento crudo o ligeramente cocinado. Los brotes más grandes debidos al *Campylobacter* no están asociados con pollo crudo sino que usualmente están relacionados con el consumo de leche no pasteurizada o agua contaminada. Los animales también pueden infectarse y algunas personas han adquirido su infección de contacto con las heces infectadas de un perro o gato enfermo. (5,6,4)

Otros alimentos implicados son las carnes rojas, despojos, moluscos, leche y quesos no pasteurizados y aguas no cloradas. La transmisión de la enfermedad se produce principalmente por contaminaciones cruzadas entre los alimentos, donde los manipuladores de alimentos, con sus prácticas higiénicas, tienen una importancia fundamental. (5,4)

El microorganismo se elimina por el tratamiento térmico (cocción). No sobrevive en las cocinas domésticas ni los tratamientos culinarios tradicionales. (5)

La dosis infectiva del *Campylobacter spp.* es baja si la comparamos con la *Salmonella spp.* Se ha demostrado experimentalmente, que entre 500-800 células microbianas son suficientes para instaurar la enfermedad; y que por debajo de 100 células la enfermedad no se desarrolla. Estas diferencias se deben a variaciones del pH del jugo gástrico del huésped y del tipo de alimento

consumido. La leche y alimentos grasos, permiten salvar la barrera ácida del estómago y producir la infección de forma más fácil. (5, 6, 4, 9)

Está demostrado que la carne de pollo es sin dudas la fuente de infección más importante. Diferentes estudios epidemiológicos han establecido que entre el 50-70 % de las infecciones esporádicas de origen alimentario por *Campylobacter spp.* se deben al consumo o manipulación de la carne (por contaminación de estas carnes con otros alimentos, por contaminación con las superficies de contacto o las superficies de corte utilizadas). Lo que no está del todo claro es la fuente de infección principal. Se sabe que la mayoría de las explotaciones avícolas de engorde están infectadas con *C. jejuni*. Las camas, pienso y agua no clorada, han estado vinculadas como vehículos de introducción y transmisión de la infección. Las jaulas, ropa, manos y calzado del personal de las explotaciones avícolas, también pueden ser vías de entrada del microorganismo. Otras fuentes podrían ser los animales domésticos o salvajes alrededor de la explotación. (5, 6, 4, 9)

Una vez ha entrado en la explotación, el *Campylobacter spp.* se disemina y coloniza el intestino de los pollos de engorde (entre 14 y 49 días de edad). Estos pollos irán la mayoría al matadero para su sacrificio, y en este transporte de la granja al matadero, por tener un contacto directo entre ellos, hace que se aumente hasta 1000 veces el grado de contaminación superficial de estos animales, sobretudo por las heces de los animales. En el matadero, en el proceso del faenado, se contaminan la mayoría de los equipos y de las herramientas, así como superficies de contacto, y maquinarias. Estudios, han revelado que la superficie del huevo fértil en el momento de la eclosión sería uno de los vehículos principales de transmisión del *Campylobacter spp.*, en las explotaciones avícolas. (5, 6, 4, 9)

4.7.1 Poblaciones susceptibles

La transmisión por los manipuladores (portadores), es poco frecuente ya que en el hombre, el *Campylobacter spp.*, es un huésped transitorio, y por tanto, una fuente poco importante de infección, pero esto puede ocurrir si la persona infectada es un niño de 2 años o está produciendo un gran volumen de diarrea, especialmente en países no industrializados. Los individuos enfermos muestran una respuesta inmune rápida y efectiva, que parece ser responsable de terminar con la enfermedad y la colonización. Esta respuesta puede proveer protección temporal para otros desafíos. No hay ninguna población animal tan susceptible a la enfermedad como los humanos. (5, 6, 4, 9)

4.7.2 Poblaciones no susceptibles

El *Campylobacter* puede ser recuperado de las heces de muchos humanos adultos asintomáticos a través del mundo industrializado, donde las infecciones son consideradas endémicas. Parecería ser que la mayoría de estas infecciones son el resultado de un pasaje transitorio del *Campylobacter* a través de los intestinos, talvez con colonización temporal y un crecimiento limitado, pero sin síntomas de la enfermedad. Las razones para esto no está claro aun. Una explicación, es que la exposición repetida al *Campylobacter* en el medio, particularmente durante la infancia, genera una respuesta inmune protectora en hospederos potenciales. Esta protección es efectiva contra la enfermedad, pero no necesariamente contra la colonización. Ciertamente, algunos estudios en animales naturalmente infectados (datos no publicados) y en humanos en áreas sub desarrolladas del mundo sugieren que múltiples cepas de *Campylobacter* pueden estar presentes, sugiriendo que hay una exposición constante de múltiples orígenes. En estos humanos y animales infectados, la excreción del *Campylobacter* es intermitente, de bajo nivel y de

vida corta, aunque puede estar potencializado cuando la competencia inmunitaria esta comprometida. (9)

En algunos animales como los perros, la transmisión fecal se aumenta durante periodos de estrés como el parto, o cambio de hogar. La variación estacional en las ovejas y el ganado también puede reflejar un estrés similar. En poblaciones de perros y humanos, expuestas en forma endémica los *Campylobacter* son transitorios. Dichas colonizaciones causan pocos problemas al hospedero, una vez su periodo de susceptibilidad a la enfermedad se ha acabado, y aunque no es muy productivo para el organismo, permite periodos de intercambio genético, y por eso permite que ocurra diversidad genética. (9)

4.8 Consecuencias a largo plazo

La mayoría de las personas que adquieren campilobacteriosis se recuperan completamente dentro de 2 a 5 días, aunque algunas veces la recuperación puede llevar hasta 10 días. En raras ocasiones, pueden resultar de la infección con *Campylobacter* algunas consecuencias a largo plazo. Algunas personas pueden tener artritis como consecuencia de la campilobacteriosis; otras pueden adquirir una enfermedad rara que afecta a los nervios del cuerpo a partir de varias semanas después de la enfermedad diarreica. Esta enfermedad, llamada síndrome de Guillain-Barré, ocurre cuando el sistema inmunológico de la persona recibe “instrucciones” de que ataque a los nervios propios del cuerpo y puede conducir a parálisis que dura varias semanas y de ordinario requiere atención intensiva. Se estima que aproximadamente 1 de cada 1,000 casos notificados de campilobacteriosis conducen al síndrome de Guillain-Barré. Hasta 40% de los casos de síndrome de Guillain-Barré en los Estados Unidos pueden haber sido desencadenados por la campilobacteriosis. (5, 9)

4.9 Consecuencias del blanco

Aunque cualquier persona puede tener una infección de *C. jejuni*, afecta a los niños debajo de 5 años y de los adultos jóvenes (15-29) con más frecuencia que otras categorías de edad. La artritis reactiva, es una complicación rara de estas infecciones, se asocia fuertemente con la gente que tiene el antígeno humano B27 (Hla-b27) del linfocito. (13)

4.10 Contaminación en los alimentos

Muchas parvadas de pollos son infectadas silenciosamente por el *Campylobacter*; es decir, los pollos son infectados con el organismo pero no muestran signos de enfermedad. El *Campylobacter* puede propagarse fácilmente de un ave a otra a través de una fuente común de agua o mediante contactos con heces infectadas. Cuando se sacrifica un ave infectada, el *Campylobacter* puede transferirse de los intestinos a la carne. Más de la mitad de las canales en los mercados de los Estados Unidos tienen *Campylobacter*. El *Campylobacter* también se halla presente en los órganos internos, especialmente el hígado. (1, 3, 8)

La leche no pasteurizada puede contaminarse si la vaca tiene una infección con *Campylobacter* en la ubre o si la leche se contamina con estiércol. El agua de superficie y las corrientes de montaña pueden contaminarse con heces infectadas de vacas o aves silvestres. Esta infección es común en el mundo en desarrollo y quienes viajan a otros países también se hallan sometidos a riesgos de contraer la infección con *Campylobacter*. (5, 6, 8)

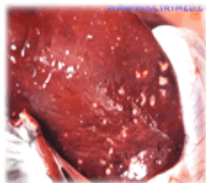
4.11 Síntomas

- Fiebre
- Náusea
- Dolor de cabeza
- Dolor abdominal
- Dolor del músculo
- Diarrea, puede ser acuosa o pegajosa y puede contener sangre (generalmente oculta) y los leucocitos fecales (células blancas). (5, 4,15)

Los síntomas generalmente aparecen de 3 a 5 días después de su exposición. Para la mayoría de personas, el *Campylobacter* ocasiona síntomas que generalmente no duran más de una semana, pero las recaídas no son infrecuentes (cerca de 25% de casos). (5, 4, 15)

La dosis contagiosa *del C. jejuni* se considera pequeña. Los estudios de alimentación humanos sugieren que cerca de 400-500 bacterias pueden causar la enfermedad en algunos individuos, mientras que en otros, se requieren mayores números. Un estudio de alimentación humana sugiere que la susceptibilidad del anfitrión también dicta la dosis infecciosa a un cierto grado. Los mecanismos patógenos del *C. jejuni* . todavía no se entienden totalmente, sino que produce una toxina lábil al calor que pueda causar la diarrea. *El C. jejuni* puede también ser un organismo invasor. (15)

4.12 Patogenia



C.jejuni se adhiere a las células del intestino delgado, principalmente a la de los segmentos distales. El microorganismo se multiplica e invade las células blanco del epitelio. Es elaborada una toxina semejante a la toxina LT que altera el sistema adenilciclasa. Al mismo tiempo, la citotoxina destruye el epitelio mucoso. La respuesta inflamatoria no controla la infección porque los microorganismos sobreviven en el interior de las células fagocitarias mononucleares. Los microorganismos de la especie *C.jejuni* que pasan a los vasos linfáticos y a la circulación sistémica son destruidos por el efecto bactericida del suero. Se producen heces diarreicas que contienen restos de células y moco, y en los frotis directos se observan productos de la respuesta inflamatoria. A simple vista, a veces se observan moco y sangre. (2)

La enteritis proliferativa del cerdo es un complejo patológico que comprende varias lesiones intestinales: adenomatosis intestinal, enteritis necrótica, ileítis regional y enteropatía hemorrágica proliferativa. La enfermedad se caracteriza por un aumento de grosor de la pared del íleon, pero incluyendo, a veces, segmentos en ambos lados. Tanto a *C.mucosalis* como a *C.hyointestinalis* se les atribuye ser los agentes causales de este síndrome, que puede ser reproducido administrando *C.hyointestinalis* a cerdos por vía oral, pero no administrándoles *C.mucosalis*. (2)

C.pylori produce una extraordinaria cantidad de amoníaco a partir del desdoblamiento de la urea (en alimentos tales como la leche). En las personas se relaciona con gastritis y con úlceras pépticas. Se supone que la gran cantidad de amoníaco producido origina un nicho protegido por debajo de la capa mucosa del estómago. Si bien no se han puesto de manifiesto toxinas, histológicamente se han observado la formación de pilares, parecidos a los

formados por las cepas enteropatógenas de *E. coli* (que se adhieren al epitelio intestinal y lo destruyen). (2)

4.13 Aspectos inmunológicos

4.13.1 Diagnostico de laboratorio

Puede realizarse el diagnóstico por la demostración del microorganismo en examen directo o a través del cultivo. El uso de los métodos serológicos para el diagnóstico tiene valor para la investigación epidemiológica, ya que en países en vías de desarrollo los títulos en la población suelen ser altos. El examen en fresco de muestras fecales diarreicas utilizando microscopía de contraste de fase o de campo oscuro, dentro de las 2 primeras horas de evacuación, puede permitir un diagnóstico presuntivo rápido. Se observa la forma y la típica motilidad con giros sobre su propio eje (motilidad en sacacorchos) de las especies de *Campylobacter* y en la mayoría de los casos se puede observar también eritrocitos y leucocitos fecales. (2, 11, 12)

Para cultivo y aislamiento a partir de materia fecal se requiere de una atmósfera microaerófila, medios de cultivo selectivos para inhibir la flora acompañante, temperatura óptima de desarrollo (42-43°C), aunque pueden desarrollar a 37°C, pH óptimo de crecimiento cercano al neutro (6,5-6,9). A partir de alimentos congelados, o de muestra de materia fecal de pacientes con tratamiento antibiótico previo, es necesario hacer un pasaje reconstituyente de la estructura celular, de por lo menos 6 horas a 37°C, por un medio en base a Caldo Brucella, succinato de sodio al 0,3%, cisteína al 0,01% y cuidando de utilizar una mezcla antibiótica que no contenga antimicrobianos que ejerzan un efecto inhibitor sobre las células dañadas (injurizadas) como es el caso de la polimixina y de la rifampicina. Para las células dañadas por calor, no hace falta realizar este pasaje. Para aislar de agua es necesario filtrar un gran volumen,

centrifugar y sembrar. También, para cuerpos de agua con corriente, se puede utilizar la tórula de Moore, la que consiste en un rollo de gasa que se deja en el agua por 18 a 24 h y luego se siembra en un caldo de enriquecimiento para posterior traspaso a medio sólido. (2)

4.13.2 Toma de muestras

Para el diagnóstico de las infecciones por *C.jejuni* se obtienen muestras de heces. Para diagnosticar la enteritis proliferativa se utilizan raspados del intestino afectado. Para obtener muestras con el fin de investigar la presencia de *C.pylori* se recomienda una biopsia de estómago. (2, 11, 12)

Las muestras de deposiciones pueden ser tomadas con hisopo rectal o bien por evacuación espontánea, pudiendo mantenerse a temperatura ambiente por algunas horas, evitando su desecación. La refrigeración de las muestras prolonga en algunos días la sobrevivencia del microorganismo. Si es necesario usar un medio de transporte, debe utilizarse el medio Cary Blair modificado por la reducción de la concentración de agar en un 0,12%. (2, 11, 12)

4.13.3 Examen directo

En la mayoría de los casos de diarrea producida por *C.jejuni*, los frotis de heces teñidos (tinción de Gram con fucsina fenicada como colorante de contraste, tinción de tipo Romanowsky) pondrán de manifiesto la presencia de numerosos bacilos finos y curvados. Las improntas de intestinos de cerdos con enteritis proliferativa contienen bacilos parecidos en el interior de las células que revisten la zona afectada. Las tinciones argénticas, como por ejemplo la tinción de Warthin-Starry, o una tinción ácido-resistente (para decolorar utilizar ácido acético al 0.5% durante 30 segundos) son más apropiadas para poner de manifiesto los organismos que se encuentran en este sitio. (7, 11)

4.13.4 Examen microscópico



Las muestras de materia fecal pueden ser examinadas a través de una tinción de Gram utilizando carbolfucsina como colorante de contraste, o por tinción simple con azul de metileno para identificar leucocitos y formas bacilares curvas. La observación en microscopio de contraste de fase o de campo oscuro de bacilos curvos y/o espiralados con gran motilidad en forma circular o de sacacorchos permite un diagnóstico presuntivo rápido cuyo valor predictivo sobrepasa el 85%. (7, 11)

4.13.5 Aislamiento

Las células de *Campylobacter* son bacilos gram-negativos curvados, espiralados y microaerófilos que requieren un bajo contenido de oxígeno para crecer. Sin embargo, a veces resulta difícil cultivar los microorganismos. Las células bacterianas reaccionan a las bajadas de temperatura alterando la morfología y fisiología celular. Con la disminución de temperatura, se forman células cocoides que producen formas viables pero no cultivables. Esto se considera la respuesta adaptativa a ambientes externos hostiles. La resucitación de células no cultivables se ha demostrado en pollos. (14,10)

Los *Campylobacter* se aíslan mejor en las muestras de intestino afectadas sembrándolas en medios selectivos que contengan agentes antimicrobianos (vancomicina, polimixina B, y trimetoprim). Cuando se intenta aislar *C.jejuni* a partir de heces, la incubación se efectúa en una atmósfera con elevadas concentraciones de CO₂, con reducida tensión de O₂, y las placas se incuban a 37 °C o a 43°C. Las muestras de biopsia de estómago recogidas para aislar *C.pylori* se deben sembrar en placas de agar-chocolate. (2, 10)

4.13.6 Microbiología molecular y serología

La serotipificación con antisueros comerciales es el método más frecuente. No obstante, muchas cepas siguen resultando imposibles de tipificar, lo que ha motivado el desarrollo de distintos métodos de subtipificación molecular. Debido a la gran diversidad genética y fenotípica de las campilobacterias, los métodos producen resultados difíciles de interpretar. Se ha sugerido que el objeto de crear diversidad es permitir la supervivencia durante la transmisión de uno a otro huésped. La diversidad puede reflejar diferencias en la virulencia. Hay evidencia de que los aislamientos humanos son más virulentos que los aislamientos de ave. Existe una gran necesidad de estandarizar el método de subtipificación molecular. El primer intento estuvo a cargo de Campynet, con su proyecto de red de la UE. Campynet ha estandarizado un método de electroforesis en gel en campo pulsado (PFGE) para la tipificación definitiva de *C. jejuni* y *C. coli*. Este método podría constituir un programa de genotipificación de cepas en brotes a escala incluso internacional. En EE.UU., se ha utilizado con éxito un método de PFGE estandarizado por PulseNet para determinar la causa ambiental de un brote de *Campylobacter*, aunque inicialmente se sospechó de un origen alimentario concreto.(4,14)

4.13.7 Cultivo en medios selectivos

Las placas de medios selectivos (agar Skirrow, Virion, Blaser, etc.) se siembran en forma directa con hisopo o con 2-3 gotas de deposiciones acuosas o de una suspensión de ellas y se disemina por estrías. Se incuban en una atmósfera microaerófila que tenga 5-10% de oxígeno y 3 a 10% de dióxido de carbono y a 42-43°C por 48 horas. Cuando se pesquisa la presencia de especies no termófilas, la incubación se hace a 37°C, en la misma atmósfera pero prolongando el período de incubación hasta 5 ó 7 días. Dado que en una

diarrea el número de *Campylobacter* es alto, no es necesario realizar enriquecimiento. Se recomienda utilizar medios de enriquecimiento sólo en caso de esperar un bajo número de microorganismos (manipuladores, convalecientes). (7, 11)

4.13.8 Método de filtración para la detección de *campylobacter* en heces

El método se basa en la separación de *Campylobacter* del resto de la flora microbiana presente en las heces, como por ejemplo los coliformes, que quedan retenidos en la superficie de una membrana de celulosa de 0,45 o 0,66 μm ; los bacilos que logran transponer la membrana van a depositarse sobre un medio rico con sangre que actuará como sustrato para el crecimiento del microorganismo. De esta manera se obtiene un cultivo selectivo, situación que reemplaza a la adición de antibióticos, para eliminar la flora acompañante. Este método se recomienda para el aislamiento de las especies emergentes (ej. *C. upsaliensis*, *C. jejuni* subsp. *doylei*).

Procedimiento: Dejar las placas de agar sangre estériles a 37°C por 1 ó 2 horas para facilitar la absorción de líquido. Depositar asépticamente con una pinza los filtros estériles de nitrocelulosa de 0,45 μm sobre la superficie del medio de cultivo. Realizar una suspensión de materia fecal en solución fisiológica (o caldo de cultivo) y con una micropipeta o pipeta Pasteur, depositar de 100 a 200 μl sobre la membrana, evitando de no derramar sobre el medio de cultivo. Dejar que se filtre por un tiempo mínimo de 30 minutos y recargar los filtros nuevamente. Una vez que se ha secado la suspensión sobre el filtro, levantarlo con la pinza y desecharlo. Es opcional estriar el filtrado. Acondicionar las placas en jarras para incubar en microaerofilia a 37°C durante 24-48 horas para una primera revisión. La incubación debe prolongarse hasta 7 días antes de dar por negativa una muestra. Si la diarrea es acuosa, no es necesario realizar una suspensión en solución fisiológica. (1)

Una vez obtenidas las colonias sospechosas de *Campylobacter*, continuar con los métodos de identificación y tipificación. (7)

4.13.9 Incubación

4.13.9.1 Atmósfera de incubación

Existen varios métodos para obtener una atmósfera adecuada para el desarrollo de estos microorganismos. (7)

a. Reemplazo de una atmósfera normal por una mezcla de gases apropiada : se retira el aire contenido en la jarra anaeróbica con bomba de vacío y se reemplaza por una mezcla conteniendo 85% de nitrógeno, 10% de dióxido de carbono y 5% de oxígeno. Algunas especies, como *C. hyointestinalis*, requieren de la presencia de hidrógeno para crecer.

b. Sobres generadores de gases especiales para *Campylobacter* : son sobres que se consiguen en el comercio (BBL, Oxoid, Bio-Merieux) que aportan una atmósfera aproximada de 5-10% de oxígeno y 5- 12% de dióxido de carbono.

c. Sobres generadores de hidrógeno y oxígeno para anaerobiosis: se utilizan sin catalizador de paladio. En general no son recomendados por el peligro de explosión que representa el hidrógeno remanente en la jarra. *Jarra con vela* la combustión de la vela aporta una atmósfera aproximada de 17-19% de oxígeno y de 2-4% de dióxido de carbono. Con este sistema el aislamiento de *Campylobacter* se mejora si se incluye al medio de cultivo el suplemento FBP que aumenta alrededor de 10 veces la aerotolerancia del microorganismo. Se postula que el rendimiento de este método es mayor a 42-43°C que a 37°C. (7)

d. Generadores caseros: reduce la atmósfera de oxígeno por consumo en reacción química y aumenta la de dióxido de carbono por medio de la disolución de bicarbonato en agua. Entre estos tenemos: (7)

- Una pastilla de boranato de sodio (0,8 gr para una jarra de 3 litros)
- Una pastilla de Alka Seltzer o Yastá
- 10 ml de agua destilada.
- Lana de acero
- Solución ácida de sulfato cúprico: Sulfato de cobre 5 gr
- Agua 100 ml
- Ac. sulfúrico 0,33 ml
- Tween 80 0,2 ml

4.13.9.2 Temperatura de incubación

Las especies termófilas de *Campylobacter* crecen mejor a 42-43°C que a 37°C. La mayor temperatura actúa como inhibidor adicional de la flora fecal. Si no se cuenta con una estufa a esa temperatura, se puede utilizar una de 37°C con las consideraciones del caso. (7)

4.13.10 Examen de las placas

Para las especies termófilas, el tiempo de incubación ideal es de 48 horas, aunque si el caso lo requiere, se pueden examinar a las 18-24 horas. Las colonias sospechosas pueden observarse planas, no hemolíticas de aspecto acuoso, grisáceas, con bordes irregulares y con tendencia a diseminarse por la estría de inoculación. Muchas veces se pueden ver incoloras. Se les debe realizar una identificación presuntiva por su posterior confirmación y tipificación. (7)

4.13.11 Identificación presuntiva

- **Tinción de Gram:** debido a que este microorganismo no se tiñe bien con safranina, se recomienda el uso de carbolfucsina (fucsina fenicada) al 0,8% como coloración de contraste. Teniendo en cuenta la morfología característica, es posible realizar sólo una coloración simple con este colorante.
- **Catalasa:** se debe colocar sobre un portaobjetos limpio una colonia de un cultivo fresco, agregar una gota de peróxido de hidrógeno al 3 %. Una reacción positiva se evidencia por la formación de burbujas producto de la liberación de oxígeno a partir de la reducción del peróxido de hidrógeno. (7)
- **Oxidasa:** se debe utilizar un buen inóculo que se coloca en un tubo de hemólisis conteniendo 0,2 ml de agua destilada a la que se le introduce un disco impregnado en la solución de oxalato de paminodimetilamina. La enzima, citocromo oxidasa es convertida a su forma activa por la transferencia de electrones al oxígeno molecular. En presencia de oxígeno molecular un gran número de electrones pueden ser transferidos por el sistema citocromo oxidasa a una cantidad de compuestos orgánicos, entre ellos a la p-aminodimetilamina. Una reacción positiva se evidencia por el desarrollo de color rojo. La prueba se realiza también con un papel filtro impregnado en la solución reactiva, la que se pone en contacto con una asada del cultivo. La aparición de un color violeta al cabo de aproximadamente 2 minutos indica reacción positiva. (7)

- **Motilidad:** se realiza por microscopía de contraste de fase o campo oscuro donde se observa microorganismos espiralados o con forma de S con movimientos en espiral o en tirabuzón. (7)

4.13.12 Identificación final

- **Crecimiento a 42-43°C y a 25°C:** Suspender al microorganismo en solución fisiológica estéril hasta una densidad óptica del # 1 de la escala de Mac Farland. Sembrar 0,5 ml de la suspensión en dos tubos con caldo brucella, incubar uno a 42-43°C y el otro a 25°C (temperatura ambiente). Controlar a las 48 horas si hubo o no desarrollo. Se puede usar también placas de agar sangre o con medios para *Campylobacter*. (7)
- **Sensibilidad al ácido nalidíxico y cefalotina:** La suspensión anterior (1 en la escala de Mac Farland) se siembra con hisopo sobre la superficie de una placa de agar sangre, agar para antibiograma u otro medio para *Campylobacter*, colocar un disco de ácido nalidíxico de 30 µg y un disco de cefalotina de 30 µg. Se incuba 48 horas y se observa si hay halo de inhibición o no a manera de determinar si la cepa es sensible a los antimicrobianos estudiados. (7)
- **Hidrólisis del hipurato:** Esta prueba se basa en la acción de la enzima hipuricasa sobre el hipurato de sodio lo que produce glicina y ácido benzoico. La reacción del reactivo (ninhidrina) produce una coloración azul-violeta en contacto con la glicina. Suspender una ansada de la cepa en 400µl de una solución hipurato de sodio al 1%. Luego de incubar a 37°C durante 2 horas, se le agrega 200 µl de solución de ninhidrina al 3,5% en acetona-butanol 1:1 por la pared del tubo y se deja en reposo a

- 37°C observándolo a los 10 minutos. La aparición de una coloración azul-violeta indica una reacción positiva que revela la presencia de glicina, producto final de la hidrólisis del hipurato. (7)
- **Producción de ácido sulfhídrico:** Se determina depositando una ansada grande en el centro de la columna del tubo del medio para SH2 (medio de Lior). Los tubos se incuban en baño María a 37°C por 2 horas. La aparición de una coloración negra alrededor del inóculo indica una reacción positiva. La reacción se basa en la liberación de ácido sulfhídrico por la acción de la enzima cisteína desulfhidrasa sobre los aminoácidos que contienen azufre. Se pone en evidencia por indicadores como sulfato ferroso, tiosulfato de sodio, etc. En caso de dudas, la incubación puede prolongarse a temperatura ambiente o a 37°C. Una alternativa consiste en usar medio de cultivo TSI o Kligler incubando en microaerofilia. (7)
- **Crecimiento en glicina al 1%:** Sembrar 0,1 ml de suspensión en un tubo de agar brucella semisólido con 1% de glicina y rojo neutro como indicador. Incubar durante 3-5 días a 37°C en microaerofilia. Observar si se forma una delgada línea de desarrollo por debajo de la superficie.
- **Crecimiento en ClNa al 3,5%:** Sembrar 0,1 ml de suspensión de una cepa en un tubo con agar Brucella semisólido con 3,5% de cloruro de sodio y rojo neutro como indicador. Incubar 3-5 días a 37°C en microaerofilia. Observar si se forma una delgada línea de desarrollo por debajo de la superficie. (7)

- **Hidrólisis de indoxil acetato:** Esta prueba se basa en la hidrólisis del indoxil acetato por medio de esterazas bacterianas, las que actúan sobre el substrato produciendo la liberación de indol. Se prepararan discos de indoxil acetato por adición de 50 µl de una solución al 10% (p/v) de acetona a discos standard y dejando secar al aire. Luego se deben guardar a 4°C en envase con desecante (sílicagel) y al abrigo de la luz. En estas condiciones duran 1 año. La técnica se puede realizar de dos formas:
 - Se adiciona una o varias colonias del microorganismo sobre un disco y se agrega una gota de agua. Si se produce la hidrólisis aparece un color azul entre 10 y 15 minutos después.
 - El otro método consiste en suspender una o varias colonias en 0,3 ml de agua destilada estéril y luego agregar el disco. La lectura se realiza igual que en el punto anterior.
- **Hidrólisis de 2,3,5 cloruro trifeniltetrazolium:** Esta prueba se utiliza como complementaria cuándo hay dudas con la prueba de hidrólisis del hipurato para diferenciar *C. jejuni* de *C. coli*. Se deben cortar tiras de papel de filtro de 7 por 1 cm embebidas en una solución de la sal de tetrazolium en agua destilada al 4% (p/v). Las tiras se secan a 60°C y se guardan a 5°C en frasco oscuro, manteniéndose estables por 6 meses. Se prepara la cepa y el medio como se ha descrito para la sensibilidad al ácido nalidíxico sustituyendo el disco por la tira impregnada con la sal de tetrazolium. Después de un periodo de incubación de 24 a 48 horas a 37° en microaerofilia se observa si ha habido o no inhibición del crecimiento. En caso de producirse desarrollo bacteriano este se observa metalizado amarillento por reducción de la sal de formarón. (7)

4.13.13 Diagnostico inmunológico

La enfermedad intestinal producida por los *Campylobacters* no se utiliza el diagnostico inmunológico. Con fines epidemiológicos, se han estudiado las respuestas de anticuerpos, valoradas mediante pruebas de inmunoabsorción ligada a enzimas. (2,4)

4.14 Tratamiento

La enteritis producida por *C.jejuni* es con mucha frecuencia auto limitante. No obstante la eritromicina y la tetraciclina son dos antibióticos eficaces. Se han descrito plásmidos R que codifican la resistencia a la tetraciclina. El control de la enfermedad, tanto en los hospitales veterinarios como en las perreras, requiere una meticulosa adhesión a medidas higiénicas tales como los protocolos del lavado de manos, de la limpieza y de la desinfección. El tratamiento de las demás enfermedades producidas por *campylobacters* es de eficacia dudosa. Las sales de bismuto asociadas a un antibiotico (ampicilina) han resultado efiaces en personas con gastritis relacionada con *C.pylori*. (2)

4.15 Resistencias antimicrobianas

En la mayoría de los casos de *Campylobacter*, no es necesaria la terapia con antibióticos. Sin embargo, en los casos graves los fármacos preferentes son la eritromicina y el ciprofloxacino. En los años noventa aumentaron las resistencias antimicrobianas, especialmente a la fluoroquinolona y el ciprofloxacino, en muchas especies de *Campylobacter*. La resistencia a la eritromicina no aumentó de forma significativa. En los últimos años, la resistencia al ciprofloxacino afectó a alrededor del 30% de los aislamientos

humanos de *C. jejuni* en muchos países europeos. El aumento de resistencias se asocia al uso de antibióticos en la cría de animales, así como a un tratamiento inadecuado en el hombre. En Irlanda, la resistencia al ciprofloxacino en aislamientos humanos y de aves no aumentó de manera significativa entre 1996 y 1998, pese a la autorización, en vigor hasta 1987, para utilizar enrofloxacin en aves. Los informes de otros países recogen resultados similares. En un estudio realizado en Dinamarca, la resistencia a las fluoroquinolonas varió considerablemente de una granja a otra, lo que indica una posible asociación entre el uso de fluoroquinolonas y el aumento de la resistencia. Sigue siendo necesario realizar estudios epidemiológicos adecuados que confirmen el vínculo entre el uso de antibióticos en animales de granja y el aumento de la resistencia a las fluoroquinolonas. La resistencia a las fluoroquinolonas también se ha asociado a viajes al extranjero, especialmente países fuera de Europa. (14, 3)

4.16 Prevención

- Cocine bien todos los productos de aves. Asegúrese de que la carne está cocinada en todos sus lados (ha dejado de estar rosada), que los jugos salen claros y que el interior se ha cocinado a 170oF (77oC) para la carne de la pechuga y 180oF (82oC) para la carne de muslo.
- Si le sirven carne de pollo insuficientemente cocinada en un restaurante, devuélvala para que la cocinen mejor.
- Lávese las manos con jabón después de manipular alimentos crudos de origen animal y antes de tocar alguna otra cosa.
- Evitar la contaminación cruzada en la cocina:
 - Utilice diferentes tableros de cortar para los alimentos de origen animal y otro tablero para los demás alimentos.
 - Limpie cuidadosamente todos los tableros de cortar, la parte superior de

los mostradores y los utensilios con jabón y agua caliente después de preparar alimentos crudos de origen animal.

-Evite consumir leche no pasteurizada o agua de superficie no tratada.

-Asegúrese de que las personas que tienen diarrea especialmente los niños, se laven las manos con cuidado y con frecuencia utilizando jabón para reducir el riesgo de propagación de la infección.

-Lávese las manos con jabón después de entrar en contacto con heces de mascotas o animales domésticos. (5, 6, 16)

4.17 Impacto en la salud pública

El impacto de la Campilobacteriosis en la salud pública se puede valorar de varias maneras. En Holanda, la carga sanitaria de infecciones por especies termofílicas de *Campylobacter* se ha evaluado mediante el uso de Años de vida ajustados por discapacidad (Disability Adjusted Life Year; DALY). DALY es la suma de los Años de vida perdidos por mortalidad prematura y los Años vividos con discapacidad, ponderada con el factor entre 0 y 1 para la gravedad de la enfermedad. Los principales determinantes de la carga sanitaria fueron gastroenteritis aguda en la población general, mortalidad asociada a la gastroenteritis y síntomas residuales de la gastroenteritis (GBS). La carga sanitaria de enfermedades asociadas a *C. jejuni* en la población holandesa se estimó en un rango de 1.000 a 2.000 DALYs por año. (14)

4.18 Infecciones por *campylobacter* en aves

Los *Campylobacter* puede colonizar la mucosa del intestino de la mayoría de hospederos de sangre caliente. Sin embargo el *Campylobacter jejuni* parece que ha evolucionado para colonizar en forma preferencial el intestino aviar. La mayoría de información se obtiene principalmente del pollo

de engorde, el cual puede ser considerado el modelo para la colonización en aves. En el mundo una gran proporción de parvadas para engorde son colonizadas con *Campylobacter*. En países con datos censales de pollos, cerca del 95% de parvadas, son positivas para *Campylobacter*. (9)

La colonización de las aves esta relacionada con la edad. La infección no puede detectarse en pollitos recién nacidos, y es usualmente detectable hasta cuando las aves tienen 2 o 3 semanas. Esta fase de atraso ocurre incluso en aves criadas con método orgánico y podría ser una característica general de la colonización en las aves. La diseminación de la infección de individuo a individuo es extremadamente rápida y virtualmente todas las aves (en parvadas de hasta 30,000) pueden ser positivas en 3 días. Esta transmisión rápida es un reflejo de una dosis infectiva baja y una potencial de colonización aumentado por un pasaje in vivo. En general, una infección por *Campylobacter* en una parvada puede ser vista como un brote agudo. Una vez ocurre la colonización, esta llega a niveles extremadamente altos; cerca de 10^7 UFC por gramo de contenido cecal o más alto. No obstante las aves colonizadas son invariablemente asintomáticas. Más aun, la colonización es persistente, sugiriendo que cualquier respuesta inmune no es efectiva en la eliminación de la infección, en estas circunstancias. Aun así, las aves mas viejas (por la postura) pueden reducir la colonización con el tiempo.(9)

En resumen, el *C. jejuni* actúa como un comensal en aves y esta situación tiene grandes beneficios para la bacteria y ningún efecto que actúe en detrimento del hospedero. (9)

V. MATERIALES Y METODOS

5.1 Materiales

5.1.1 Recursos Humanos

- Estudiante investigador
- Asesores del estudio

5.1.2 Equipo de laboratorio

- Refrigeradora
- Incubadora
- Autoclave
- Balanza
- Placas de Petri
- Frascos de vidrio
- Mechero Bunsen
- Asas para siembras bacteriológicas de punta circular
- Hielera
- Marcador
- Campana de flujo laminar
- Jarra para anaerobios
- Bolsas plásticas estériles
- Pinzas estériles
- Tijeras estériles
- Pipetas Pasteur
- Tubos de ensayo estériles

5.1.3 Recursos Biológicos

- 50 muestras de heces directamente extraídas de los intestinos y 50 muestras de carne y vísceras de los pollos faenados (hígado y alas).

5.1.4 Medios y soluciones

- Placas con agar Skirrow
- Suplemento Selectivo para Campylobacter (Vancomicina 2,0mg, Polimixina 0,05mg, Trimetopim 1,0mg)
- Caldo BHI mas Suplemento para Campylobacter
- Sistemas Campylobacter para generación de condiciones microaerófilas
- Filtros de 47mm de diámetro y 0.45 μm de poro de nitrocelulosa
- Agua Oxigenada al 3%
- Varillas indicadoras de prueba de Oxidasa

5.2 Metodología

5.2.1 Universo

100 pollos a faenarse en el rastro artesanal de 250 que matan al día, localizado en la ciudad capital.

5.2.2 Diseño de estudio

Se tomaron 10 muestras completamente al azar. Las muestras a tomar en el día fueron: 10 de intestino y 5 de la carne (muslos y alas) y 5 de vísceras (hígado) de los pollos faenados durante 5 días. Al final se obtuvieron un total

de 100 muestras, siendo 50 de heces y 50 cincuenta de carne y vísceras de pollo.

5.2.3 Obtención y toma de muestras

Las muestras de heces se tomaron de los intestinos, mientras que las muestras de carne y vísceras se obtuvieron a partir de las piezas de pollo y de los hígados respectivamente. Todas las muestras fueron debidamente identificadas y los datos de la recolección se anotaron en la tabla respectiva (anexo 1, 2 o 3), dependiendo del tipo de muestra (heces, carne o visceras). Las muestras se transportaron al laboratorio en bolsas plásticas estériles y en refrigeración.

5.2.4 Procedimiento de laboratorio

5.2.4.1 Preparación del agar Skirrow en el laboratorio

- Se disolvió el agar a una relación de 40 gramos del medio de cultivo en un litro de agua destilada.
- Se esterilizó la solución en el autoclave durante 15 minutos a una temperatura de 121°C.
- Se dejó enfriar a una temperatura de 40 a 50°C.
- Se incorporó de 50 a 70 ml de sangre desfibrinada de oveja y un frasco de “suplemento selectivo” por cada 200 ml de medio de cultivo. Se esperó a que el pH de la mezcla fuera 7,3 más menos 0,1.
- Se vertió la mezcla en placas de Petri.
- El medio de cultivo preparado es claro y amarillento antes de la adición de la sangre.
- Se realizó el control de esterilidad.

- Se almacenó en refrigeración en bolsas plásticas selladas hasta su uso.

5.2.4.2 Procesamiento de las muestras en el laboratorio

5.2.4.2.1 Heces

5.2.4.2.1.1 Por filtración

- El intestino se cortó con tijeras estériles para extraer el contenido fecal realizando una mezcla con solución salina.
- Se colocó una membrana de nitrocelulosa de 0.45 micras sobre las Placas de Agar Skirrow.
- Utilizando un micropipeta o pipeta Pasteur, se depositó de 100 a 200 microlitros de la solución de heces sobre la membrana de Nitrocelulosa.
- Se dejó que la solución se filtre hacia el Agar Skirrow por un tiempo mínimo de 30 minutos.
- Una vez que se ha secado la suspensión sobre el filtro, se levantó con una pinza estéril y se desechó.
- Se acondicionó las placas en jarras adecuadas para ambiente de microaerofilia.
- Las placas se incubaron a 42 °C por un periodo de 48 horas
- Se revisó a las 48 horas si hubo crecimiento.
- La incubación puede prolongarse hasta 7 días antes de darse por negativa la muestra.

5.2.4.2.1.2 Directo

- Se cortó un trozo de intestino y con un hisopo se tomó un poco de muestra del contenido fecal.

- Se sembró por agotamiento en una placa de agar de Skirrow.
- Las placas se incubaron a 42 °C por un periodo de 48 horas.
- Se revisó a las 48 horas si hubo crecimiento.

5.2.4.2.2 Carne y vísceras

- Se colocaron las muestras de carne y vísceras de pollo en caldo de enriquecimiento (Caldo de BHI con Suplemento de antibióticos)
- Se incubaron las placas en jarras adecuadas para ambiente de microaerofilia por 48 horas a 42 °C.
- Las placas se incubaron a 37°C por un periodo de 48 horas.
- Una vez cumplido el período de incubación se sembró en placas de agar selectivo (agar Skirrow)
- Se incubó a 42°C durante 48 horas y se observó si existió crecimiento.

5.2.4.3 Estudio macroscópico

Se observó en las colonias sospechosas las siguientes características:

- Forma y elevación (Planas)
- Características hemolíticas (No hemolíticas)
- Color (Grisáceas)
- Borde de la colonia (Con bordes irregulares)
- Apariencia (De aspecto cremoso)

5.2.4.4 Estudio microscópico

5.2.4.4.1 Tinción de Gram:

- Se encendió el mechero
- Se flamearon las láminas para quitar el exceso de grasa
- Se agregó una gota de agua destilada en una lámina
- Se esterilizó el asa, se destapó el tubo, se flameó y se introdujo el asa para tomar una colonia.
- Se extendió con el agua en la lámina
- Se fijó el frotis sobre la llama
- Luego se agregó cristal violeta sobre el frotis y se dejó por un minuto, luego se lavó con agua
- Se agregó lugol por un minuto y se lavó
- Se decoloró con alcohol por 10 segundos y se lavó
- Debido a que este microorganismo no se tiñe bien con safranina, se recomienda el uso de la carbolfucsina (fucsina fenicada) al 0.8% como coloración de contraste.
- Secar con papel secante

5.2.4.4.2 Morfología

Se observó la morfología del microorganismo utilizando la lámina de tinción de Gram, utilizando el objetivo de inmersión (Por medio de coloración gram; observamos la forma característica de bacilos, delgados, curvos y gram negativo).

5.2.4.5 Pruebas bioquímicas para la identificación presuntiva de *Campylobacter* sp.

- **Catalasa:** Se colocó una colonia de cultivo fresco sobre un portaobjetos limpio. Se agregó una gota de peróxido de hidrógeno al 3%. La reacción positiva se evidenció por la formación de burbujas producidas al liberarse oxígeno. Esta reacción es resultado de la reducción del peróxido de hidrógeno.
- **Oxidasa:** -Con el asa de inoculación se tomó del medio de cultivo una colonia aislada, que haya crecido bien.
 - -Se aplicó la colonia sobre la zona reactiva y se frotó con el asa de inoculación.
 - -Al cabo de aproximadamente 20 a 60 segundos se comparó con la escala colorimétrica.
- **Motilidad:** Se realizó por microscopía de contraste de fase o campo oscuro. Se observaron microorganismos espiralados o con forma de “S” que presentaron movimientos en espiral o en tirabuzón.

5.3 Análisis estadístico

El muestreo se realizó por conveniencia. Para el análisis de datos se utilizó estadística descriptiva (media, distribución estándar y diferencia de proporciones). Los resultados se presentan en tablas y gráficas.

VI. RESULTADOS Y DISCUSION

Como resultado del presente estudio, se demostró la presencia de *Campylobacter* sp. en un 48% en heces, carne y vísceras de pollo provenientes de un rastro artesanal de la capital. (Ver gráfico 1).

Con el fin de aislar *Campylobacter* sp a partir de heces de pollo, obtuvimos un 72% de muestras positivas por medio del método de filtración, lo que nos demuestra que este método fue el más efectivo que el método Directo, debido a que la membrana filtrante posee un diámetro de 47mm y 0.45 μm de poro de nitrocelulosa permitiendo el paso únicamente del *Campylobacter* sp. (ver gráfico 3).

Con el método Directo, en el cual dejamos las muestras de heces reposando en el suplemento de antibióticos recomendado, no se obtuvieron los resultados esperados, ya que su efectividad no fue tan evidente como el Método de Filtración, pues obtuvimos un 40% de muestras positivas, añadido el problema del crecimiento entre el *campylobacter* de otra gran cantidad de bacterias provenientes de la flora intestinal normal del ave, lo que nos demuestra que el medio de antibióticos no inhibió efectivamente el crecimiento de otros microorganismos (ver gráfico 2).

Como es normal a nivel intestinal se encuentra una carga bacteriana alta (flora total en los animales), lo cual dificulta la efectividad del medio de antibióticos.

El porcentaje de contaminación en heces es mucho mayor que en vísceras y carne, tomando como patrón de comparación los resultados obtenidos con el método de Filtración por ser un método más confiable, debido a que la

contaminación de las vísceras y carne con la flora del intestino es cruzada y las heces están en relación directa.

Las colonias de *Campylobacter* sp. crecidas en el agar de Skirrow, macroscópicamente se observaron de la siguiente manera:

- Forma y elevación (Planas)
- Características hemolíticas (No hemolíticas)
- Color (Grisáceas)
- Borde de la colonia (Con bordes irregulares)
- Apariencia (De aspecto cremoso)

Para la identificación presuntiva del *Campylobacter* sp. en las muestras de heces, vísceras y carne, se utilizó como estudio microscópico la metodología de la tinción de Gram y tres tipos de pruebas bioquímicas (Catalasa, Oxidasa y motilidad), las cuales nos confirman el diagnóstico al aislar el *Campylobacter* sp,. Como resultado de estas pruebas el 48% resultaron positivas. (Ver cuadro 2).

De acuerdo a los porcentajes obtenidos en los resultados, es evidente el alto grado de contaminación de la carne y vísceras de pollo en el proceso de faenado en rastros artesanales, esto debido a la falta de higiene en el proceso, debido a una contaminación cruzada con la materia fecal donde se encuentra el *Campylobacter* sp. (ver cuadro 1).

VII. CONCLUSIONES

- El mejor método para aislamiento de *Campylobacter* sp en muestras de heces, es el de Filtración con membranas de nitrocelulosa.
- Se determino una presencia del 52% *Campylobacter* sp. En las muestras de heces, carne y vísceras de pollo provenientes de un rastro artesanal
- El suplemento de antibióticos utilizado en el método directo, para inhibir el crecimiento de la flora normal del intestino, **no fue 100% efectivo.**
- La presencia de *Campylobacter* en la carne y vísceras de pollo, esta directamente relacionada con la contaminación fecal que se produce en el procesamiento del faenado.

VIII. RECOMENDACIONES

- Implementar métodos de aislamiento de *Campylobacter* como parte del control de calidad en rastros del país.
- Realizar estudios que indiquen la prevalencia de *Campylobacter* en carne de pollo en rastros tecnificados.
- Utilizar el método de filtración para el aislamiento de *Campylobacter* sp., ya que evita el crecimiento de otros microorganismos normales de la flora bacteriana del ave.
- Durante el proceso de faenado implementar un mayor control de las prácticas higienico-sanitarias para evitar la contaminación cruzada en la carne y vísceras de pollo.
- Una buena cocción en la carne y vísceras de pollo, ya que esto disminuye el riesgo de contaminación con *Campylobacter* sp. para los seres humanos.

IX. RESUMEN

En el presente estudio se tomaron muestras de heces, carne y vísceras de pollo provenientes de un rastro artesanal de la capital de Guatemala, con el fin de determinar la presencia de *Campylobacter* sp., cuya distribución fue la siguiente : 50 de heces, 25 de carne (muslos y alas) y 25 de vísceras (hígado).

Se utilizaron dos métodos para el aislamiento del *Campylobacter* sp en las muestras de heces, siendo el primero el método de Filtración, donde se utilizó una membrana de Nitrocelulosa y el segundo por método Directo donde se deja reposar las muestras de heces en una solución de antibióticos.

Para las muestras de carne y vísceras también se utilizó el método Directo donde las muestras se dejaron reposar en el medio antibiótico y luego se sembraron en el agar de Skirrow (medio selectivo para *Campylobacter* sp).

Se utilizaron pruebas microscópicas como la coloración de Gram y pruebas bioquímicas como Catalasa, Oxidasa y motilidad para realizar el diagnóstico presuntivo.

Con el fin de aislar *Campylobacter* sp a partir de heces de pollo, obtuvimos un 72% de muestras positivas por medio del método de filtración y un 28% negativas, lo que nos demuestra que este método fue más efectivo que el método Directo, debido a que la membrana filtrante posee un diámetro de 47mm y 0.45 μ m de poro de nitrocelulosa permitiendo el paso únicamente del *Campylobacter* sp, comparado con el Directo en el cual crecieron otros microorganismos pertenecientes a la flora intestinal normal del intestino de las aves, dificultando su identificación.

Del total de muestras evaluadas se determino que el 48% de muestras fueron positivas y el 52% negativas a *Campylobacter* sp. en heces, carne y vísceras de pollo, lo que nos demuestra el alto grado de contaminación que existe en el proceso de faenado artesanal, provocado por el contacto de las heces con la carne y vísceras del ave.

Con el fin de prevenir este tipo de contaminación se recomienda que se tomen medidas higienico-sanitarias tanto en el proceso de faenado como a la hora de preparar y consumir los alimentos, por medio de una buena cocción.

X. BIBLIOGRAFÍA

1. Barreda P. 2004. Infecciones por Campylobacter (en línea). s.l. Consultado 5 ene. 2005. Disponible en www.pediatraldia.cl/campylobacter.htm
2. Biberstein, LE; Chung Zee, Y. 1990. Tratado de microbiología veterinaria. Zaragoza, ES, Acribia. 137-140p.
3. Campylobacter; características biológicas, principales reservorios (en línea). s.f. s.l. Consultado 5 ene. 2005. Disponible en <http://216.120.230.86/~laremor/php/infotrabajo.php?materia=biologia&clave=campylo>
4. Canals, A. 2003. Campylobacteriosis en aves de corral (en línea). s.l. Consultado 4 ene. 2005. Disponible en www.midia.com.mx/estases_aves/ago-05-04/esta_semana_avessp.htm
5. Centro para el Control y la Prevención de enfermedades. 2004 Campylobacteriosis (en línea). US. Consultado 13 feb 2005. Disponible en www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/campylobacter_g_sp.htm
6. Diario de la seguridad alimentaria. 2003. Desconocido Campylobacter (en línea). s.l. Consultado 13 febrero 2005. Disponible en www.consumaseguridad.com/web/es/sociedad_y_consumo/2003/10/31/9136.php

7. Fernández, H; Price, L. 2002. Manual de procedimientos Campylobacter. Chile; Instituto de microbiología clínica, Universidad Austral de Chile. 25p.
8. Indiana State Department of Health. s.f. Acerca de....Campylobacteriosis (en línea). Indiana, US. Consultado 5 ene. 2005. Disponible en www.in.gov/isdh/healthinfo/quick_facts-spanish/campylobactre.htm
9. International society for infectious diseases. 2002. The ecology of campylobacter jejuni in avian and human host and in the environment. International journal of infectious disease. Inglaterra. no.6: 3s16-3s19.
10. Koneman, WE; Janda, MW. 1992. Diagnostico microbiológico. 3 ed. Buenos Aires, Panamericana. 336-341p.
11. Manual de medios de cultivo. 1994. Alemania, Merck. 364p.
12. Oxoid. sf. The evolution of media and methodology for selective enrichment of campylobacter in foods. Food-borne pathogens. Inglaterra. no.3:11-13.
13. United States Food and Drug Administration (USFDA). 1992. Campylobacter jejuni (en línea). US. Consultado 25 feb. 2005. Disponible en www.cfsan.fda.gov/~mow/chap4.html
14. Takkinen, J; Ammon, A. 2001. Undécimo taller internacional de trabajo en materia de Campylobacter, Helicobacter y Organismos Afines (en línea). Freiburg, DE. Consultado 5 ene. 2005. Disponible en www.eurosurveillance.org/em/v08n11/0811-324.asp?langue=03&

15. Viénot,.E. 2004. Campylobacter una bacteria y unos peligros todavía bastante desconocidos (en línea). s.l. Consultado 5 ene. 2005.
Disponibile en www.avicultura.com/docsav/SA2004Oct567-574.pdf - 23
Feb 2005

XI. ANEXOS

ANEXO 1
MUESTRA DE HECES

ID: HC -----

LUGAR: Rastro: Ciudad Guatemala.

FECHA: _____ / _____ / _____

HORA: _____ AM

RESULTADOS

1. **CRECIMIENTO EN AGAR SKIRROW:** POSITIVO ☐ NEGATIVO ☐

2. **EVALUACIÓN MACROSCÓPICA**

a. Forma y elevación: _____

b. Característica hemolítica: HEMOLÍTICA ☐ NO HEMOLÍTICA ☐

c. Color: _____

d. Borde: _____

e. Apariencia: _____

3. **EVALUACIÓN MICROSCÓPICA**

a. Tinción Gram: GRAMPOSITIVO ☐ GRAMNEGATIVO ☐

b. Pruebas Bioquímicas:

i. Catalasa: POSITIVO ☐ NEGATIVO ☐

ii. Oxidasa: POSITIVO ☐ NEGATIVO ☐

iii. Motilidad: POSITIVO ☐ NEGATIVO ☐

Descripción del movimiento: _____

ANEXO 2
MUESTRA DE CARNE

ID: Ca -----

LUGAR: Rastro: Ciudad Guatemala.

FECHA: _____ / _____ / _____

HORA: _____ AM

RESULTADOS

4. **CRECIMIENTO EN AGAR SKIRROW:** POSITIVO ☐ NEGATIVO ☐

5. EVALUACIÓN MACROSCÓPICA

a. Forma y elevación: _____

b. Característica hemolítica: HEMOLÍTICA ☐ NO HEMOLÍTICA ☐

c. Color: _____

d. Borde: _____

e. Apariencia: _____

6. EVALUACIÓN MICROSCÓPICA

a. Tinción Gram: GRAMPOSITIVO ☐ GRAMNEGATIVO ☐

b. Pruebas Bioquímicas:

i. Catalasa: POSITIVO ☐ NEGATIVO ☐

ii. Oxidasa: POSITIVO ☐ NEGATIVO ☐

iii. Motilidad: POSITIVO ☐ NEGATIVO ☐

Descripción del movimiento: _____

ANEXO 3
MUESTRA DE HÍGADO

ID: Li -----

LUGAR: Rastro: Ciudad Guatemala.

FECHA: _____ / _____ / _____

HORA: _____ AM

RESULTADOS

7. **CRECIMIENTO EN AGAR SKIRROW:** POSITIVO ☐ NEGATIVO ☐

8. EVALUACIÓN MACROSCÓPICA

a. Forma y elevación: _____

b. Característica hemolítica: HEMOLÍTICA ☐ NO HEMOLÍTICA ☐

c. Color: _____

d. Borde: _____

e. Apariencia: _____

9. EVALUACIÓN MICROSCÓPICA

a. Tinción Gram: GRAMPOSITIVO ☐ GRAMNEGATIVO ☐

b. Pruebas Bioquímicas:

i. Catalasa: POSITIVO ☐ NEGATIVO ☐

ii. Oxidasa: POSITIVO ☐ NEGATIVO ☐

iii. Motilidad: POSITIVO ☐ NEGATIVO ☐

Descripción del movimiento: _____

Cuadro No. 1 Resultados obtenidos de la siembra en agar Skirrow para el aislamiento de *Campylobacter* sp. en muestras de heces, carne y vísceras de pollo de engorde en un rastro artesanal de la ciudad de Guatemala, abril 2005

	Positivos	Negativos
Muestra de Heces (Método Directo)	10	15
Muestra de Heces (Método Filtración)	18	7
Muestras de Carne	10	15
Muestras de Vísceras (Hígado)	10	15
Totales	48	52

Cuadro No. 2 Resultados de las pruebas presuntivas en la identificación de *Campylobacter* sp. en muestras de heces, carne y vísceras de pollo de engorde en un rastro artesanal de la ciudad de Guatemala, abril 2005.

	Coloración de Gram		Prueba de la Catalasa		Prueba de Oxidasa		Motilidad	
	Positivos	Negativos	Positivos	Negativos	Positivos	Negativos	Positivos	Negativos
Muestra de Heces (Método Directo)	10	15	10	15	10	15	10	15
Muestra de Heces (Método Filtración)	18	7	18	7	18	7	18	7
Muestras de Carne	10	15	10	15	10	15	10	15
Muestras de Vísceras (Hígado)	10	15	10	15	10	15	10	15
Totales	48	52	48	52	48	52	48	52

Gráfico No.1 Resultados Totales de la presencia de *Campylobacter* sp. en muestras de heces, carne y vísceras de pollo de engorde en un rastro artesanal de la ciudad de Guatemala, abril 2005.

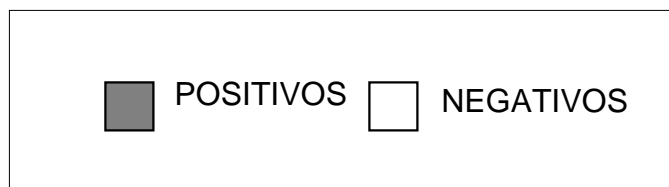
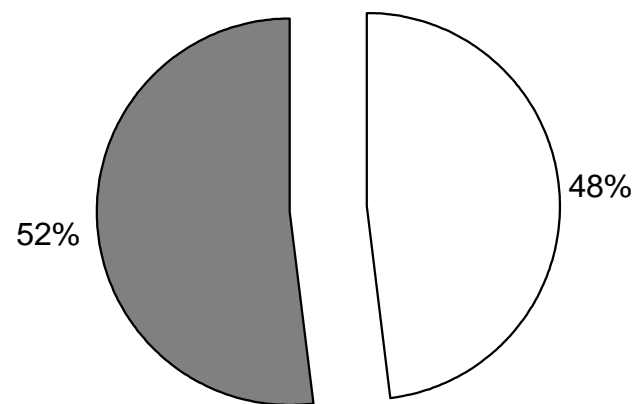


Gráfico No.2 Resultados de la presencia de *Campylobacter* sp. en muestras de heces (método directo) de pollo de engorde en un rastro artesanal de la ciudad de Guatemala, abril 2005.

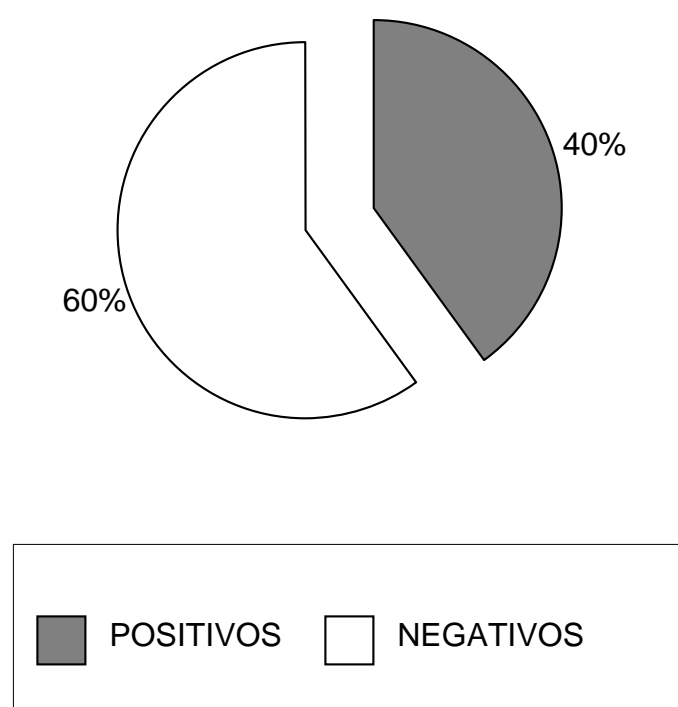
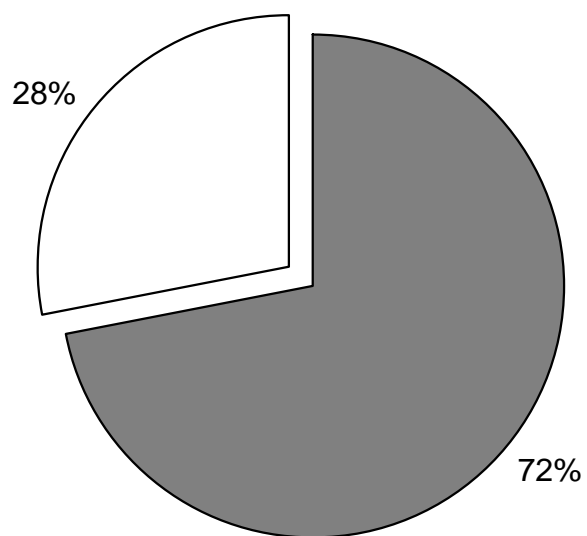


Gráfico No.3 Resultados de la presencia de *Campylobacter* sp. en muestras de heces (método de filtración) de pollo de engorde en un rastro artesanal de la ciudad de Guatemala, abril 2005.



■ POSITIVOS □ NEGATIVOS

Gráfico No.4 Resultados de la presencia de *Campylobacter* sp. en muestras de carne de pollo de engorde en un rastro artesanal de la ciudad de Guatemala, abril 2005.

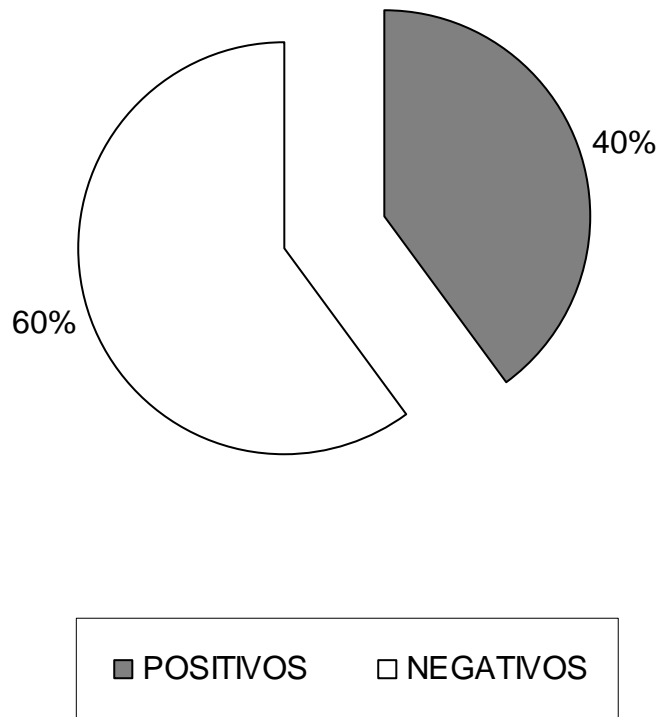


Gráfico No.5 Resultados de la presencia de *Campylobacter* sp. en muestras de vísceras (hígado) de pollo de engorde en un rastro artesanal de la ciudad de Guatemala, abril 2005.

